

## 【総説】

## 第七回 高安賞最優秀賞受賞論文

論文 「CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts, and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process」

Journal of Immunology

第181巻第9号 6384頁～6393頁 2008年11月掲載

呉 俣、李 影奕、松島綱治、馬場智久、向田直史 共著

マウスの肺転移過程における、ケモカインCCL3とそのレセプターCCR5による、腫瘍内白血球・線維芽細胞集積の調節と血管新生誘導

呉 俣（うー ゆー）

## はじめに

種々のがんにおいて、血行性あるいはリンパ行性におきる肺転移は、がん患者の予後に大きな影響を与える。<sup>1)</sup> がん細胞と白血球・線維芽細胞などの宿主細胞との相互作用のもと、がんの転移が進行すると考えられているが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。<sup>2)</sup> マウス腎臓がん細胞株であるRenca細胞をマウス尾静脈に接種すると、マクロファージ・好中球などの白血球と線維芽細胞の集積をともなった、多数の転移巣が肺臓内に生じることを、我々は以前の研究で認めている。<sup>3)</sup> 今回、我々は、マクロファージなどの白血球浸潤過程に深く関与する

と考えられているケモカインのうち、特にマクロファージに作用するCCL3・CCL4・CCL5と、これらのケモカインに対する特異的レセプターであるCCR1ならびにCCR5陽性細胞の、Renca細胞の尾静脈接種によって生じる肺転移過程での役割について検討を加えた。

## 方法

1) 8週齢のBALB/cマウス（以下野生型マウスと略す）とCCL3・CCR1・CCR5遺伝子を欠損したマウスの尾静脈に、 $0.5 \times 10^5$ 個のRenca細胞を接種し、経時的に肺を摘出し、肺内腫瘍数を計測した。野生型マウスとCCR5欠損マウス

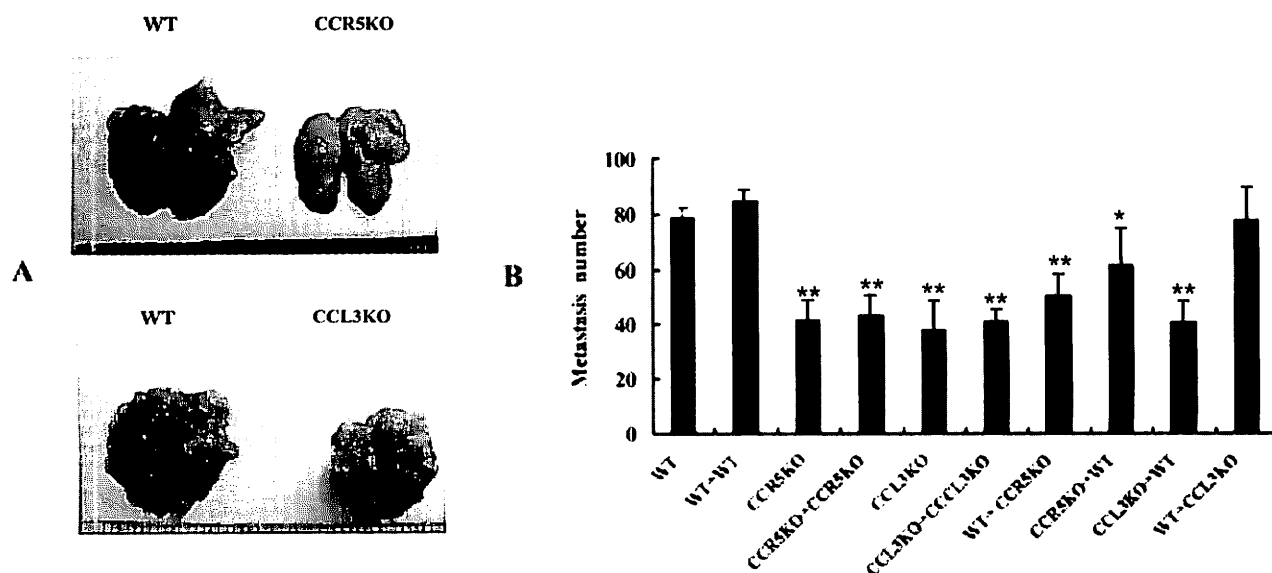


図1A. Renca細胞を静脈投与21日目の、野生型、CCR5欠損、CCL3欠損マウスの肺の肉眼的所見。1B. Renca細胞を静脈投与21日目の、種々のマウスでの肺内腫瘍数。

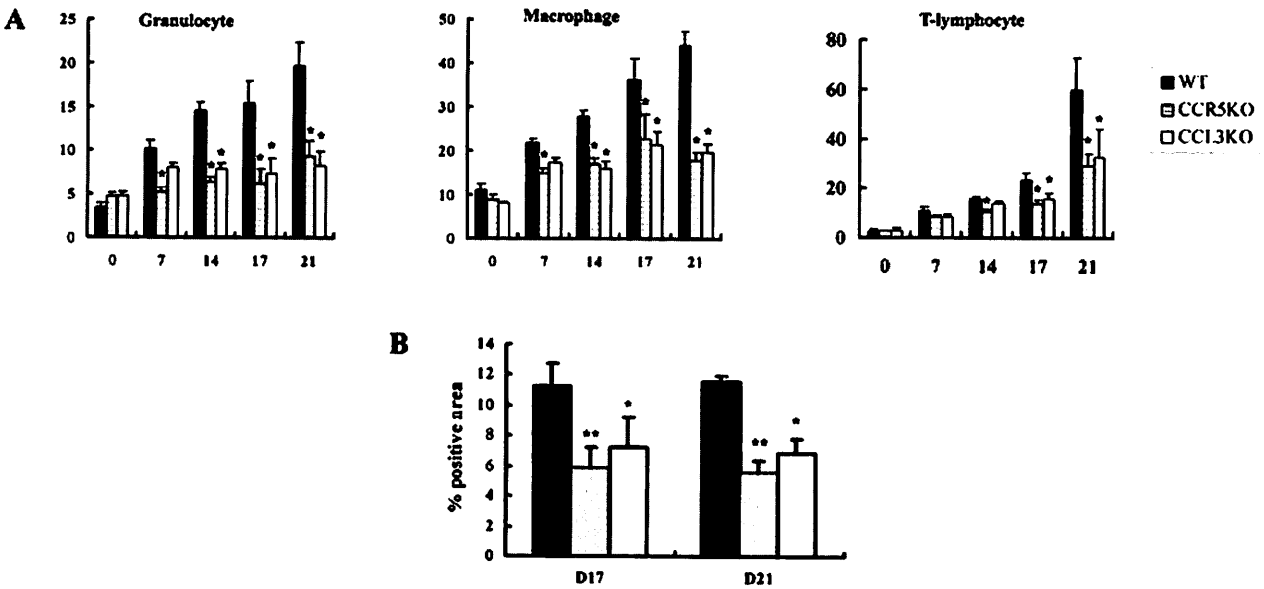


図2A. Renca細胞投与後の肺内Gr-1陽性顆粒球，F4/80陽性マクロファージ，CD3陽性Tリンパ球数。  
図2B. Renca細胞投与後の肺内I型コラーゲン陽性線維芽細胞数。

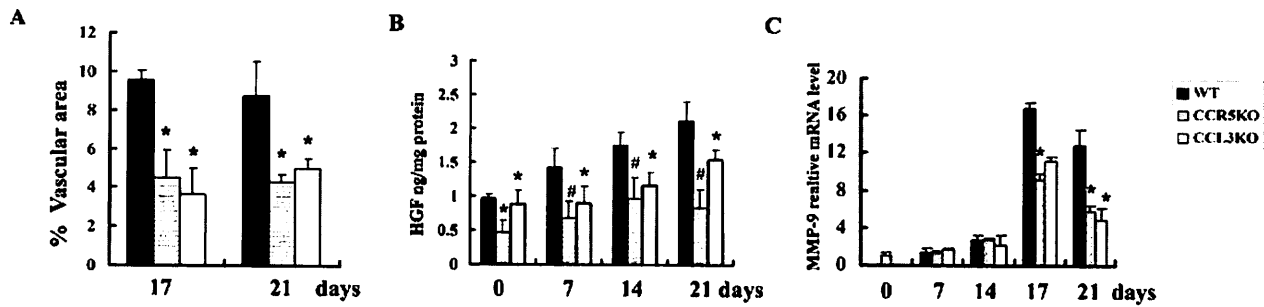


図3A. Renca細胞投与後の腫瘍内CD31陽性血管領域。  
図3B. Renca細胞投与後の肺内HGF含量。  
図3C. Renca細胞投与後の、定量的RT-CPR法にて肺内MMP-9 mRNAレベル。

との間で作成した骨髓キメラマウスに対しても同様の処置を行い、腫瘍形成数を計測した。

2) 肺組織を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色、浸潤白血球数・線維芽細胞数・血管新生を免疫組織化学的に検討した。

3) 肺組織からタンパク抽出液を得て肝細胞増殖因子 (HGF) 濃度を測定するとともに、total RNAを抽出しマトリックスメタプロテナーゼ(MMP)のmRNA発現をリアル・タイム RT-PCRにて検討した。

結 果

1) Renca細胞を尾静脈に接種すると、接種14日目後に顕微鏡的転移巣が、接種21日目には肉眼的な転移巣が生じた。CCL3・CCL4のmRNA発現が接種14日目後より亢進した。CCL3・CCL4に対するレセプターであるCCR1ならびにCCR5のうち、CCR5 mRNAの発現だけが接種21日目において亢進していた。肺臓内CCL3・CCL4濃度は、接種14日目後から上昇していた。組織免疫染色では、接種前には

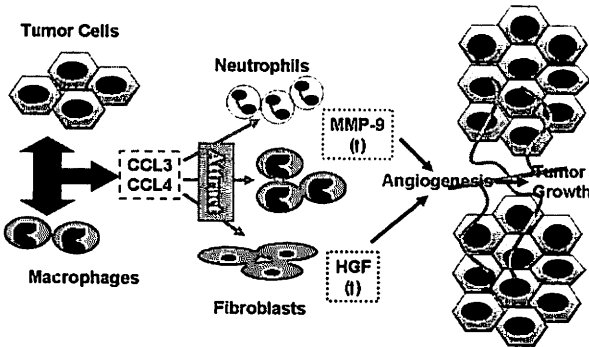


図4. 肺転移過程におけるCCL3-CCR5系の想定される病態生理学的役割。

CCL3・CCL4が肺マクロファージで検出された一方で、Renca細胞接種後は浸潤細胞とともに腫瘍細胞にも検出された。CCR5タンパクは、Renca細胞接種前には大血管・気管支・マクロファージで検出されたのに対して、接種後では転移巣周辺に集積した細胞に検出された。

- 2) 野生型マウスと同様に、CCR1, CCR5, CCL3欠損マウスにRenca細胞を尾静脈に接種すると、CCR5あるいはCCL3欠損マウスでのみ、血管新生が減弱するとともに、肺転移巣の形成も著明に減弱した (図1A)。野生型マウスとCCR5欠損マウス間で作成した骨髓キメラ・マウスの解析から、骨髓由来細胞が野生型マウスあるいはCCR5欠損マウス由来であっても転移巣の形成が減弱したことから (図1B)、CCR5を発現している骨髓由来細胞と非骨髓由来細胞との両方が、転移巣形成に関与していることが示唆された。
- 3) Renca細胞を接種したCCR5・CCL3欠損マウスでは、同様の処置を行った野生型マウスの肺に比べて、マクロファージ・顆粒球・CD3陽性T細胞ならびにI型コラーゲン陽性線維芽細胞の集積が、有意に減弱していた (図2)。さらに、血管新生の程度もこれらの遺伝子欠損マウスでは減弱していた (図3A)。
- 4) 種々の血管新生因子のタンパク含量を検討したところ、Renca細胞を接種したCCR5・CCL3欠損マウスでは、同様の処置を行った野生型マウスに比べて、HGF含量が低下していた (図3B)。マトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) のmRNA発現を同様に検討したところ、MMP-9のmRNA発現亢進の減弱がみとめられた (図3C)。
- 5) 二重蛍光免疫染色では、肺転移巣に集積しているマクロファージ・顆粒球にMMP-9タンパクが検出されたのに対して、HGFタンパクはI型コラーゲン陽性の線維芽細胞に検出された。さらに、CCL3刺激によって、腹腔内マクロファージでのMMP-9の、肺由来線維芽細胞によるHGFの、mRNAならびにタンパク・レベルでの発現が増強された。

## 考 察

以上の結果とMMP-9ならびにHGFが著明な血管新生作用を保有することを考え合わせると、肺転移過程においては、宿主細胞とがん細胞の相互作用で産生されたCCL3が、CCR5陽性

のマクロファージ・顆粒球ならびに線維芽細胞を集積させるとともに、これらの細胞によるMMP-9ならびにHGFの発現を誘導し、転移巣の形成に寄与していると考えられた (図4)。これらの知見は、肺転移の新たな制御方法の開発の基盤になることが期待される。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導とご助言を頂いた向田直史教授に感謝の意を表します。また、種々のご協力とご支援、ご助言を頂いた、馬場智久博士・李影奕博士を始めとするがん研究所分子生体応答研究分野の皆様から感謝いたします。

## 文 献

- 1) Eccles, S.A., and D.R. Welch. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369: 1742-1757, 2007.
- 2) Balkwill, F., and A. Mantovani. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539-545, 2001.
- 3) Tomita, Y., X. Yang, Y. Ishida, Y. Nemoto-Sasaki, T. Kondo, M. Oda, G. Watanabe, G.. N. Chaldakov, C. Fujii, and N. Mukaida. Spontaneous regression of lung metastasis in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Int. J. Cancer* 112: 927-933, 2004.



## Profile

所 属：四川大学・医学部附属華西病院・血液内科  
 2000年 華西医学院 (現・四川大学・医学部) 卒業  
 2000年～2004年 四川大学医学部附属華西病院・研修医 (内科ならびに血液内科)  
 2004年 金沢大学がん研究所研究生  
 2005年 金沢大学大学院医学系研究科入学  
 2009年 同上終了